

# CHIAN SIEMENISTÄ VALMISTETTAVA KASTIKEPOHJA KOIRILLE



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Hämeenlinna, Bio- ja elintarviketekniikka

Kevät 2018

Emma Roberts

Bio – ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
Insinööri (AMK)  
Hämeenlinna

---

<b>Tekijä</b>	Emma Roberts	<b>Vuosi</b> 2018
<b>Työn nimi</b>	<b>Chian siemenistä valmistettava kastikepohja koirille</b>	
<b>Työn ohjaaja</b>	Tuija Pirttijärvi	

---

## TIIVISTELMÄ

Tällä hetkellä kasvipohjaisten ruokien suosio on noussut hurjasti ja ihmiset ovat tulleet tietoisemmiksi ostamansa ruoan alkuperästä ja siihen liittyvistä eettisistä kysymyksistä.

Koiranruokamarkkinoilla on paljon valinnanvaraa, mutta suurin osa ruoista on valmistettu eläinproteiinista.

Tämä opinnäytetyö oli osa tuotekehitys projektia, jossa kehitellään markkinoille chian siemenistä valmistettua tuotetta. Tässä työssä suunniteltiin tuotteelle kastikepohja.

Tarkoitus oli tarkastella chian siementen käyttöä osana koiran ruokavalioita sekä tehdä eroa kokonaisten ja rouhittujen siementen välillä koiran ruoansulatuksen näkökulmasta. Työssä tarkasteltiin geelin muodostusta sekä selvitettiin lämpökäsittelyn vaikutusta geelin rakenteeseen ja sen proteiinipitoisuuteen.

Koirien ruoansulatuskanava on lyhyt ja niiden hampaat soveltuvat vain ruoan paloitteluun. Tästä syystä koiran elimistö ei pysty hyvin hyödyntämään kasvien ravintosisältöä ilman niiden esikäsittelyä.

Tutkimuksissa päädyttiin siihen lopputulokseen, että rikkain proteiinipitoisuus geelissä saavutettiin rouhituilla siemenillä, jonka seos oli lämpökäsitelty. Rouhinta rikkoi siemenen rakenteen vapauttaen sen sisällön geeliin ja lämpökäsittely näytti tehostavan proteiinien liukenemista siihen.

**Avainsanat** eläinten ruoat, tuotekehitys, kastikepohja

**Sivut** 28 sivua, joista liitteitä 7 sivua



Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering  
Hämeenlinna

---

<b>Author</b>	Emma Roberts	<b>Year</b> 2018
<b>Subject</b>	A Sauce Base for Dogs from Chia Seeds	
<b>Supervisor</b>	Tuija Pirttijärvi	

---

ABSTRACT

The interest towards plant based foods has been increasing because people are starting to pay more attention to where the food is produced and the ethical values behind that.

Nowadays there are various types of products in the dog food market but many of them contain animal protein. The thesis took part in a product development project where the main purpose was to create a product from chia seeds. In the thesis the focus was on creating a sauce base from chia seeds.

This thesis studied how chia seeds can be used as a part of a canine's diet. It also discussed the differences between whole seeds vs. ground seeds and compared the results from the perspective of the dog's digestion. In addition, the process of how the gel is formed and how the heat treatment affects the gel's structure and the protein content in it were explored.

Canines' digestive tract is short and their teeth are capable of only chopping food. This means that the body can not benefit from the vegetarian diet very well if any preparations are not made.

The outcome of the thesis was that the richest protein content in the gel occurs when the seeds were ground and the mix went through a heat treatment. When the seed's structure was broken it released its content to the gel and the heating process seems to have increased dissolving the proteins.

**Keywords** animal feed, product development, sauce base

**Pages** 28 pages including appendices 7 pages



# SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	CHIA-KASVI .....	1
2.1	Historia .....	2
2.2	Ravintosisältö .....	3
2.3	Haittavaikutukset sekä allergia .....	3
3	GEELI .....	4
3.1	Geeli elimistössä.....	4
3.2	Geelin muodostus .....	5
4	KOIRAN RAVITSEMIKSESTA .....	5
4.1	Chian siemenet koiran ruokavaliossa.....	6
4.2	Eläimillä tehdyt tutkimukset chian siementen vaikutuksista elimistöön .....	6
5	LAINSÄÄDÄNTÖ .....	6
6	KASTIKEPOHJAN TUOTEKEHITYS .....	7
6.1	Geelin valmistus: Siementen ja veden suhde .....	8
6.2	Lämpökäsittely ja pH.....	9
6.3	Proteiinin määrittely geelistä.....	10
6.3.1	Näytteiden esikäsittelyt.....	10
6.3.2	Menetelmä vaiheet .....	11
6.3.3	Mittaus spektrofotometrillä .....	12
7	TUTKIMUSTULOSTEN TARKASTELU .....	13
7.1	Geelin muodostus: veden ja siementen suhde.....	13
7.2	Lämpökäsittelyt ja pH.....	13
7.3	Proteiinin määrittely geelistä, spektrofotometrin tulokset.....	15
8	PROSESSI JA SEN SUUNNITTELU .....	17
8.1	Siementen esikäsittely .....	17
8.2	Veden lisäys ja sekoitus.....	17
8.3	Lämpökäsittely .....	18
8.4	pakkaus ja varastointi.....	18
8.5	Prosessin vuokaavio .....	18
9	PÄÄTELMÄT JA POHDINTA .....	19
	LÄHTEET .....	20
Liite 1	Proteiini määrittämisessä käytetty menetelmäohje	
Liite 2	Spektrofotometrimääritykset standardinäytteistä	
Liite 3	Spektrofotometrimääritykset chian siemen näytteistä	

## 1 JOHDANTO

Mayojen kielen sana chia, tarkoittaa voimaa. Legendat kertovat, että intiaanit olisivat käyttäneet chian siemeniä ennen sotaan lähtemistä. Vielä tuhansien vuosienkin jälkeen nämä siemenet kuuluvat ruokavalioon Keski- ja Etelä-Amerikassa. (Luontaistukku n.d.)

Opinnäytetyö oli osa tuotekehitysprojektia, jonka tarkoituksena on kehittää koiranruokamarkkinoille kasvipohjainen tuote. Työssä keskityttiin luomaan tuotteelle kastikepohja chian siemenistä.

Työssä tutkittiin kokonaisten siementen eroja rouhittuihin siemeniin ja tarkasteltiin tuloksia koiran ruoansulatuksen näkökulmasta.

Keskeisenä teemana oli geelin muodostus ja siihen liittyvät tutkimukset, joilla selvitettiin tuotteelle oikeanlainen koostumus ja mahdollisimman rikas proteiinipitoisuus. Työssä tutkittiin myös lämpökäsittelyn vaikutusta geelin koostumukseen ja sen proteiinipitoisuuteen.

Tutkimustulosten ja havaintojen perusteella suunniteltiin tuotteelle valmistusprosessi.

## 2 CHIA-KASVI

Chia eli *Salvia hispanica* on ruohovartinen kasvi ja se kuuluu huulikukkaiskasvien heimoon. Sitä esiintyy luonnonvaraisena Meksikossa ja Guatemalassa. Kasvi on yksivuotinen ja kasvaa noin metrin mittaiseksi. Chia-kasvin kukat ovat tähkämäisiä ja ne voivat olla valkoisia, sinisiä tai purppuran värisiä (kuva 1). (Petruzzello 2017.)



Kuva 1. Chia kasvi (ABC news 2016.)

Chia on aavikkokasvi, joka ei vaadi paljoa vettä. Se menestyy hiekkamaisessa savimaassa ja on pakkasherkkä sekä tarkka päivän pituudesta. Kasvi sietää hyvin hyönteisiä ja vastustaa hyvin sairauksia. Siksi se onkin hyvä kasvi luomuviljelyyn. Chiaa kasvatetaan sen siementen vuoksi. Siemenet ovat halkaisijaltaan noin yhden millimetrin (1 mm) mittaisia ja ne muodostavat veden kanssa geelin. Siemenet ovat täplikkäitä ja kiiltäviä ja niiden väri vaihtelee tumman ruskeasta harmaan valkoiseen (kuva 2). Nykyisin sitä viljellään kaupallisesti monessa maassa, kuten Boliviassa, Argentiinassa, Perussa, USA:ssa ja jopa Australiassa. (Petruzzello 2017.)



Kuva 2. Chian siemeniä (Heal with food n.d.)

## 2.1 Historia

Atsteekit yleensä paahtoivat ja jauhoivat siemenet jauheeksi. Viestinviejät sekä sotilaat luottivat näiden siementen tarjoamaan ravitsemukseen pitkillä matkoillansa. Espanjalaiset valloittajat aikoinaan kielsivät tämän kasvin viljelyn ja korvasivat sen ohralla ja vehnällä. (Petruzzello 2017.)

Kasvia ei juuri hyödynnetty 1900-luvun loppuun asti, vaikka se saikin hieman huomiota Yhdysvalloissa vuonna 1980. Tuolloin se tuli tunnetuksi ”chia lemmikeistä”, jotka olivat terrakotan tyyllisiä eläinfiguureja, joissa kasvatettiin chiaa (kuva 3, s. 3). Vasta 1990-luvun alussa, kun maatalouden insinööri Wayne Coates alkoi puhua chian puolesta, huomattiin tämän kasvin potentiaali sekä viljelyskasvina että terveellisenä ruokana. (Petruzzello 2017.)





Kuva 3. "Chia lemmikki" (Amazon n.d.)

## 2.2 Ravintosisältö

Siemenet sisältävät 25–40 % öljyä. Öljyssä on 20 % omega-6-linoli happoa sekä 60 % omega-3-alfalinoleenihappoa. Näitä ei pystytä valmistamaan synteettisesti. Rasvaa siemenissä on 30–33 %, proteiinia 15–25 %, hiilihydraattia 26–41 %, kuitua 18–30 %. Siemenet sisältävät myös paljon antioksidantteja, vitamiineja sekä mineraaleja. Chian siemenissä ei ole gluteiinia. (Ali, Yeap, Ho, Beh, Tan & Tan. 2012.)

Voidaan ajatella, että yksi ruokalusikallinen näitä siemeniä, sisältää saman verran omega-3-rasvahappoja kuin 10 kapselia kyseistä valmistetta. Siementen sisältävä kuitu on sulavaa ja sitä on neljä kertaa enemmän kuin runsaskuituisessa ruisleivässä. Tästä johtuen siitä on apua suoliston toiminnalle. (Luontaistukku n.d.)

Toisin kuin monet muut siemenet, chian siemenet sulavat hyvin kokonaisina eikä niitä ole pakko rouhia hyötyäkseen siemenen ravintoaineista (Petruzzello 2017.)

## 2.3 Haittavaikutukset sekä allergia

Chian siementen aiheuttamat allergiat eivät ole yleisiä, mutta niitä esiintyy. Chian siemen saattaa aiheuttaa allergiaa henkilöillä, joilla on heikko immuunipuolustus. Henkilöille, jotka ovat allergisia muille kasveille, kuten oreganolle, tinjamille, sinappikasville tai seesamille, saattavat chian siemenet aiheuttaa allergisen reaktion. Tämä siksi, että kasvit ovat taksonomialtaan tai muista syistä samankaltaisia kuin chia. (Singh 2014.)

Koska chian siemenet sisältävät paljon omega-3-rasvahappoja, saattavat ne ohentaa verta. Tästä syystä leikkaukseen menevän tai verta ohentavia

lääkkeitä käyttävän ei suositella syövän chian siemeniä. Tähän ryhmään kuuluvat myös ne, joilla on matala verenpaine. (Heal with food n.d.)

Chian siementen yleinen sivuvaikutus on ruoansulatusongelmat, kuten ummetus, ripuli ja ilmavaivat. Nämä ovat kuitenkin vältettävissä chian siementen oikeanlaisella käytöllä. Chian siementen vaikutusta sikiöön ja imettäviin on tutkittu vain hyvin vähän. (Heal with food n.d.)

### 3 GEELI

Chian siemenet muodostavat geelin nesteen kanssa. Mikään muu siemen ei yllä chian tasolle hydrofiilisyydessä. Siemenen pinnalla olevat mikrokuidut absorboivat jopa yhdeksän kertaa siemenen painon verran nestettä (kuva 4). Siemenet ja geeli ovat mauttomia. (MySeeds Chia n.d.)



Kuva 4. Siementen ympärille muodostunut geeli.

#### 3.1 Geeli elimistössä

Muñozin, Cobosin, Diazin, & Aguileran (2011) tekemän julkaisun mukaan Rubio (2002) kertoo, että geeli saa aikaan eräänlaisen esteen hiilihydraattien ja niitä pilkkovien ruoansulatusentsyymien välille. Tämä vähentää hiilihydraattien pilkkoutumista sokereiksi ja samalla lisää kylläisyyden tunnetta.

Geeli on vahvaa ja sitä on vaikea poistaa siemenen pinnalta. Tämän vuoksi suolisto joutuukin tekemään töitä rikkoakseen sen. Geeli niin sanotusti huuhtelee suolistoa matkallaan sekä vapauttaa nestettä pitkän aikaa taasisesti elimistön käyttöön. Kuidut toimivat suolistossa lakaisijan tavoin tehden ruokamassan liikkumisesta helpompaa. Elimistö ei pysty hajottamaan kuituja, mutta suolistossa elävät bakteerit pystyvät. Liukenevia kuituja kutsutaan prebiooteiksi, jotka ovat suolistossa elävien probioottien (bakteerien) ravintoa. Koska siemenet ja geeli ovat mauttomia, niiden lisääminen mihin tahansa juomaan tai ruokaan on helppoa. Tosin erittäin happamat nesteet, kuten sitruuna- ja greippimehut, eivät muodosta gee-

liä siementen kanssa. Geeli on ensin muodostettava esimerkiksi veden kanssa ennen happamiin juomiin lisäystä. (MySeeds Chia n.d.)

### 3.2 Geelin muodostus

Kun siemen joutuu kosketuksiin nesteen kanssa, muodostuu sen ympärille välittömästi läpikuultava, eräänlainen liimakapseli (mucilage). Tämä kapseli saavuttaa maksimaalisen paksuutensa vedessä kahden tunnin aikana. Kapselissa voidaan havaita kaksi kerrosta. Sisempi kerros on muodostunut oksistoa muistuttavasta rakenteesta ja ulompi kerros taas on sumuinen ja homogeeninen. Siemenen pinnalla on ns. liimasoluja eli mucilage-soluja, joihin kapseli alkaa muodostua. (Muñoz ym. 2011.)

Muñoz ym. (2011) ovat työssään tutkineet ja valokuvanneet mikroskooppilla chian siementä sekä sen muodostamaa geeliä.

He havaitsivat siemenen ulkokuoressa kolme kerrosta:

1. Uloin kerros sisältää ohutseinäisiä soluja, joihin liimakapseli muodostuu.
2. Kovassa (scleroid) kerroksessa on ohuita ja pitkiä soluja, jotka muistuttavat kuituja. Nämä kuidut venyvät hitaasti joutuessaan kosketuksiin nesteen kanssa, muodostaen lopulta pylväsmäisiä rakenteita siemenen pinnalle.
3. Ohutta ja sisintä kerrosta kutsutaan endokarppiseksi kerrokseksi.

Koska kuidut, jotka reagoivat nesteeseen, sijaitsevat ulkokuoren keskimäisessä kerroksessa, rikkovat ne lopulta siemenen uloimman kerroksen laajetessaan (Muñoz ym. 2011.)

## 4 KOIRAN RAVITSEMUKSESTA

Koirat ovat lihansyöjiä, mikä fysiologisesti tarkoittaa, että niiden ruoansulatuskanava on lyhyt ja sen tilavuus on pieni. Toiminta perustuu entsyymeihin ja ravinteet imeytyvät pääosin ohutsuolessa. Paksusuolessa kehoon imeytyy lähinnä vain nestettä. Tämän seurauksena koirat tarvitsevat ruokaa, joka on korkeaenergistä. (Evidensia n.d.)

Koirien hampaat on tarkoitettu paloittelemaan ruokaa, joten ne eivät pysty hienontamaan sitä kuten kasvissyöjät. Tämä tarkoittaa sitä, että koira nielee isoja paloja, joten kasviksia syödessään sen elimistö ei hyödy sen tuomasta ravitsemuksesta kovinkaan hyvin. Kasvien soluseinät vaativat tuhoamista. Tämä voidaan tehdä mekaanisesti tai kypsennyksen avulla. (Evidensia n.d.)

Ensisijaisesti koira saa energiansa rasvasta, mutta tärkkelystä pystytään hyödyntämään myös tehokkaasti. Proteiineilla on iso merkitys solujen uusiutumisessa ja kudosten rakennuksessa. (Evidensia n.d.)

#### 4.1 Chian siemenet koiran ruokavaliossa

Chian siemenissä on paljon omega-3- ja omega-6-rasvahappoja. Ne ovat myös oikeassa suhteessa (3:1) koiran elimistölle. Tämän ansiosta koiran elimistö pystyy hyödyntämään niitä vaikuttaen positiivisesti mm. karvan laatuun ja ihon kuntoon. Rasvahapot tukevat myös koiran immuunijärjestelmää. Se voi lievittää tulehduksia sekä edistää ja ylläpitää limakalvojen terveyttä. Koska geeli sulaa hitaasti elimistössä, voi se auttaa ylläpitämään nestetasapainoa sekä pitämään verensokerin tasaisena, kuten luvussa 3 on kerrottu. Ruoansulatusta edistää siementen suuri kuitupitoisuus. (Chia de Gracia n.d.)

Nykyisin on paljon koiria, joilla on allergioita ja muita sairauksia. Lohiöljyn syönti omega-rasvahappojen saamiseksi saattaa olla tietyillä yksilöillä allergisista syistä poissuljettua. Chian siemenet ovat hyvä vaihtoehtoinen omega-rasvahappojen lähde koiran ruokavaliossa.

#### 4.2 Eläimillä tehdyt tutkimukset chian siementen vaikutuksista elimistöön

On tutkittu kanoille syötettävien siementen vaikutusta kananmuniin. Osalle kanoja on syötetty pellavansiemeniä, toisille chian siemeniä ja toisille taas rapsisiemeniä. Chian siemeniä syöneet kanat munivat munia, joissa oli korkein pitoisuus alfa-linoleenihappoa (omega-3-rasvahappojen esiaste). On myös tutkittu chian siementen vaikutusta rottien veri-plas-massa. Tutkimuksissa havaittiin niin sanotun ”huonon kolesterolin” eli LDL:n (low-density lipoprotein) sekä triglyseridin (TG) merkittävä lasku, kun taas ”hyvän kolesterolin” HDL:n (high density lipoprotein) ja monityydyttymättömyyden omega-3-rasvahappojen määrä kasvoi seerumissa. Myös kaneilla ja sioilla tehdyt ruokintatutkimukset osoittivat niiden lihasmassassa monityydyttämättömien rasvojen nousun, joka aiheutti myös paremman flavoorin lihassa. (Ali ym. 2012.)

## 5 LAINSÄÄDÄNTÖ

Chian siemenet kuuluvat kategoriaan uuselintarvikkeet, jotka ovat elintarvikekäyttöön tulleita uutuuksia, joilla ei ole aikaisempaa käyttöhistoriaa Euroopassa. Koska käyttöhistoriaa ei ole, niiden turvallisuutta alettiin kyseenalaistamaan. Tästä syystä on luotu näille elintarvikkeille hyväksymismenettelyt. Ensimmäinen uuselintarvikeasetus tuli voimaan toukokuussa 1997 ja sen mukaan käyttöturvallisuus tulisi varmistaa tuotteilla, joilla ei ole EU:n alueella käyttökokemusta. Tätä asetusta uudistettiin

vuonna 2015 ja se tuli voimaan vuonna 2018. Nykyisin se on uuselintarvikeasetus (EU) 2015/2283. (Evira 2018A.)

Euroopan elintarviketurvallisuusviranomainen (EFSA) arvioi uuselintarvikkeiden turvallisuuden ja komissio päättää markkinointiluvasta. Tämä taho ylläpitää listaa uuselintarvikkeista, jotka on hyväksytty (Unionin luettelo). Perinteisesti kolmansissa maissa käytetyt elintarvikkeet voivat päästä markkinoille helpotetulla ilmoitusmenettelyllä. Tällä listalla on chia-kasvin siemenet, jotka luokitellaan tiettyjä kasvisteroleita sisältäviin elintarvikkeisiin. Chian siemenillä on siis uuselintarvikelupa. (Evira 2018A.)

Kaikki tuotteet, jotka on tarkoitettu eläinten syötäväksi, lasketaan rehuiksi ja ne noudattavat rehulainsäädäntöä (Korkalainen 2018).

Rehulainsäädäntö löytyy EU lainsäädännössä yleisestä elintarvikeasetuksesta (EY) N:o 178/2002 (Evira 2018B). Laissa mm. sanotaan, että rehun on oltava turvallista ihmisille, eläimille ja luonnolle. Laissa myös määritellään rehutyypit. Eviran rehutyypien merkintäoppaan mukaan tämän työn tuote luokiteltaisiin täydennysrehuksi.

”Täydennysrehulla tarkoitetaan rehuseosta, jossa on korkeita pitoisuuksia tiettyjä ravintoaineita, mutta joka koostumuksensa perusteella on riittävä päiväannokseksi vain, jos sitä käytetään yhdessä muiden rehujen kanssa” (Evira 2015).

## 6 KASTIKEPOHJAN TUOTEKEHITYS

Kokeellisten tutkimusten tarkoitus oli selvittää tuotteelle oikeanlainen koostumus, tutkia proteiinien liikkumista geeliin sekä selvittää lämpökäsittelyn vaikutus geelin rakenteeseen ja sen proteiinipitoisuuteen. Tutkimusten tarkoitus oli tehdä eroa kokonaisista siemenistä valmistetun geelin ja rouhittujen siementen geelin välillä sekä selvittää kuinka siementen proteiinit saadaan mahdollisimman tehokkaasti koiran ruoansulatuksen käyttöön. Tutkimustulosten perusteella luotiin tuotteelle valmistusprosessi.

Raaka-aineena käytettiin Luontaistukun luomusertifioituja chian siemeniä. Siementen alkuperämaa on Paraguay ja eränumero L087. Parasta ennen merkintä on 22.02.2019. Siemenille ei ole tehty lämpökäsittelyjä ennen pakkausta (Luontaistukku 2018).

## 6.1 Geelin valmistus: Siementen ja veden suhde

Tarkoituksena oli tutkia siementen ja veden suhdetta toisiinsa niin, että aikaansaatiin kastikemainen koostumus. Seoksen oli oltava helposti kaadettavissa ja pysyä yhtenä kastikevirtana.

Valmistettiin neljä näytettä (taulukko 1, s. 9). Jokaiseen näytteeseen oli punnittu 3,0 grammaa siemeniä, joka vastaa teelusikan määrää. Näytteet 1, 2 ja 3 olivat kokonaisia siemeniä. Näytettä 4 varten siemenet rouhittiin huhmareessa. Huhmareeseen jäi tumma alue. Tämä osoitti selvästi sen, että siemenet ovat öljyisiä (kuva 5).

Näytteeseen 1 lisättiin viileää hanavettä 50 ml ja sitä ei sekoitettu. Havaittiin epätasainen koostumus sekä geelityyneitä siemenkasoja ja niiden alle jääneitä siemeniä, jotka eivät päässeet kosketuksiin nesteen kanssa (kuva 6, s. 9). Näytteeseen 2 lisättiin vettä 100 ml ja näytteeseen 3 ja 4 50 ml. Näytteitä 2, 3 ja 4 sekoitettiin jatkuvasti 10 minuutin ajan magneettisekoittajalla. Sekoituksen aikana havaittiin näytteen 3 rakenteen olevan hyvin geelimäinen. Lisättiin näytteeseen 3 vielä 30 ml vettä. Rakenteessa oli vieläkin havaittavissa geelimäisyyttä, mutta seos oli selkeästi kastikemaisempaa ja kaadettaessa valui tasaisesti. Näyte 4 geelityi vahvasti ja viskositeetti oli selkeästi korkeampi kuin näytteessä 3. Näytteeseen 4 lisättiin vettä vielä 40 ml ja silmämääräisesti saavutettiin samanlainen koostumus kuin näytteessä 3. Sekoituksen lopussa voitiin havaita, että näyte 2 oli liian juoksevaa joten sen sekoittamista jatkettiin vielä 10:llä minuutilla. Sekoituksen jälkeen näytteitä seisotettiin 15 minuuttia. Tällä haluttiin seurata hyytyykö geeli paikalleen. Todettiin, että näin ei tapahtunut sekoitusajan jälkeen. Käytettiin hyväksi näytteiden 3 ja 4 tietoa jatkotutkimuksissa.



Kuva 5. Öljyinen alue huhmareessa, jossa chian siemenet on hienonnettu.



Kuva 6. Ilman sekoitusta näyte geeliytyi kasoiksi sisältäen myös kuivia chian siemeniä.

Taulukko 1. Chian siementen ja veden suhteen optimointi oikean koostumuksen aikaansaamiseksi. Näytteiden 3 ja 4 koostumus oli halutunlainen.

	Chian siemenet (g)	Vesi (ml)	sekoitusaika (min)	seisotusaika (min)
Näyte 1 kokonainen	3,0	50	-	15
Näyte 2 kokonainen	3,0	100	20	15
Näyte 3 kokonainen	3,0	50 + 30 = 80	10	15
Näyte 4 rouhittu	3,0	50 + 40 = 90	10	15

## 6.2 Lämpökäsittely ja pH

Lämpökäsittelyn tarkoitus oli havainnollistaa tapahtuuko muutoksia koostumuksessa sekä selvittää sen vaikutus proteiinisältöön.

Näytteet päätettiin kuumentaa keittolevyllä kiehuvaan. Kuumennuksen aikana huomattiin näytteiden alkavan kiehua noin 90°C:n lämpötilassa



(kuva 7) ja lämpötilan saavuttaessa 94–95°C astetta, alkoivat ne kiehua todella voimakkaasti. Yrityksistä huolimatta lämpötilaa ei saatu nostettua korkeammaksi vaarantamatta näytteitä ja työturvallisuutta. Näytteet kiehuivat noin 10 minuuttia.

Jokaisen näytteen pH (taulukko 2, s. 11) oli mitattu ennen proteiinimäärittäytystyön aloittamista. Kuumennetut näytteet oli jäähdytetty vesihauteessa ennen pH-mittausta ja proteiinimäärittelyn aloitusta.



Kuva 7. Kuumakäsittelyn alkukiehumisvaihe. Vasemmalla on rouhittu siemen seos.

### 6.3 Proteiinin määrittäminen geelistä

Tarkoituksena oli tutkia kokonaisten ja rouhittujen siementen geelissä olevia proteiinipitoisuus-eroja lämpökäsittelyn saaneiden ja ei saaneiden näytteiden välillä. Menetelmänä käytettiin Lowryn-menetelmää (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall 1951), Hämeen ammattikorkeakoulun Biotalouden tutkimusryhmän modifioiman työohjeen (Liite 1) mukaan.

#### 6.3.1 Näytteiden esikäsittelyt

Esikäsittelyssä käytettiin hyväksi aiempia tuloksia siementen ja veden suhteesta toisiinsa (taulukko 1). Valmistettiin yhteensä neljä näytettä. Ensimmäiset kaksi näytettä oli sekoitettu, mutta ei lämpökäsitelty. Toiset kaksi oli sekoitettu ja lämpökäsitelty. Kummassakin tavassa oli kokonaisuutena siemenistä valmistettu seos ja rouhittu siemenseos.

Näytteet KE ja RE (Taulukko 2, s. 11), eivät käyneet läpi lämpökäsittelyä, vaan ainoastaan sekoitusvaiheen. Näytteet KJ ja RJ (Taulukko 2) kävivät läpi sekoituksen ja lämpökäsittelyn.



Taulukko 2. Näytteiden pH, sekä esikäsitteilyt ennen proteiininmäärittystä.

Näyte	selitys	pH	mittauslämpötila °C
KE	kokonainen siemen, ei lämpökäsittelyä	7,01	19,3
RE	rouhittu siemen, ei lämpökäsittely	6,69	19,3
KJ	kokonainen siemen, lämpökäsitelty	6,42	23,7
RJ	rouhittu siemen, läm- pökäsitelty	6,21	26,5

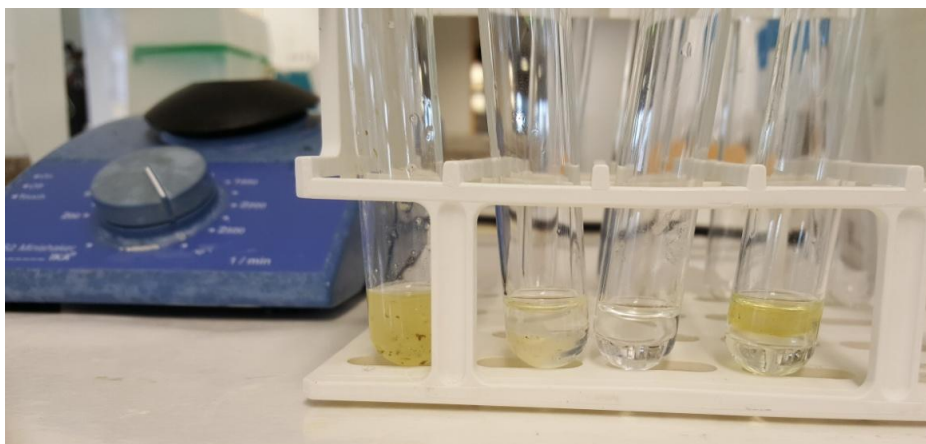
### 6.3.2 Menetelmä vaiheet

Näytteiden pipetointi osoittautui haastavaksi, sillä kokonaisten siementen näytteissä geeli oli paksua. Pipetin kärjen leikkaus auttoi, mutta oli varottava siementen mukaan tuloa pipettiin. Rouhittujen siementen seos oli todella sotkuinen ja siitä oli mahdotonta pipetoida edustavaa näytettä. Rouhittujen siementen näytteet oli suodatettava, joka sekin osoittautui työlääksi vahvan geelin muodostuksen vuoksi. Pipetointi kuitenkin onnistui suodatuksen jälkeen, mutta oli vaativaa.

Menetelmäohjeen mukaisesti suoritettua sentrifugoinnin jälkeen, jokaisesta näytteestä oli havaittavissa supernatanttia, paitsi rouhitussa, kuumementamattomassa näytteessä (RE). Tämän näytteen liuos oli täysin kirkas ja vasta liikuteltaessa koeputkea, voitiin sen reunalla huomata pieni, kirkas ja geelimäinen kertymä. Tämä kertymä laskettiin näytteen proteiinisakaksi ja supernatantti (kirkas neste) poistettiin pipetoimalla. Näytteisiin lisättiin menetelmäohjeen mukaan reagenssia liuottamaan jäljelle jäänyttä proteiinisakkaa (kuva 8, s. 12).

Standardit tehtiin menetelmäohjeen (Liite 1) mukaan.

Näytteisiin (kuva 9, s. 12) ja standardeihin tehdyt reagenssilisäykset suoritettiin menetelmäohjeen mukaan.



Kuva 8. Proteiiniääritysnäytteisiin suodatuksen, sentrifugoinnin ja supernatantin poiston jälkeen jääneet proteiinisakat, joihin on lisätty reagenssia. Tarkoituksena liuottaa jäljelle jäänyt proteiini sakka. Näytteet vasemmalta RJ, KJ, KE ja RE.



Kuva 9. Mittausvalmiit näytteet reagenssien lisäysten jälkeen. Näytteet vasemmalta RJ, RE, KE ja KJ.

### 6.3.3 Mittaus spektrofotometrilla

Mittaus suoritettiin Shimadzu Ordior UV-1800 UV -spektrofotometrilla. Menetelmäohjeen mukaan laitteessa käytettiin aallonpituutta 550 nanometriä. Standardisuora löytyy työn liitteistä (Liite 2). Absorbanssimittaukset tehtiin sekä laimentamattomista että 1:10 laimennetuista mittausnäytteistä. Tällä haettiin osviittaa pitoisuuksista, joiden haluttiin osuvan standardisuoralle, jonka raja-arvot ovat 0,05–0,5 g/l. Kaikista näytteistä tehtiin ensimmäisten tulosten perusteella vielä toiset rinnakkaiset mittausnäytteet. Tällä haluttiin saada tiettyjen näytteiden tulokset osu-

maan standardisuoralle, jotta tuloksista saataisiin mahdollisimman luotettavia. Standardisuoralle osuneiden rinnakkaisnäytteiden tuloksia voitiin käyttää näytteen pitoisuuden keskiarvon laskennassa.

Näytteen RJ laimentamaton mittaussnäyte meni raja-arvon 0,5 g/l yli ja sen laimennettu mittaussnäyte osui standardisuoralle. Tehtiin vielä kaksi mitattavaa näytettä 1:10 laimennoksella, jotta saatiin rinnakkaisia tuloksia. Näytteelle RE kävi kuten näytteelle RJ.

Näytteen KE absorbanssit osuivat standardisuoralle, mutta pitoisuuden ollessa pieni sille ei tarvinnut tehdä laimennoksia toiselle mittauskierrokselle. Näytteen KJ absorbanssit osuivat standardisuoralle, mutta lähelle sen ylä- ja alarajaa. Tämän vuoksi kokeiltiin toiselle mittauskierrokselle laimennosta 1:2. Tulokset osuivat lähelle standardisuoran keskikohtaa.

## 7 TUTKIMUSTULOSTEN TARKASTELU

### 7.1 Geelin muodostus: veden ja siementen suhde

Siementen ja veden suhde -koesarjalla saatiin määritettyä haluttu koostumus sekä kokonaisille että rouhituille siemenille. Koostumukseksi haettiin kastikemaista rakennetta, joka on kaadettaessa juoksevaa ja yhtenäistä.

Rouhitulla siemenellä suhde on 1:30, joka tarkoittaa massaprosentteina 3,33 %. Kokonaisilla siemenillä suhde on 3:80, joka tarkoittaa massaprosentteina 3,75 %. Näillä aikaansaatiin haluttu koostumus.

Siemeniä on veden lisäyksen jälkeen sekoitettava jatkuvasti, jotta muodostunut geeli ei hyytyisi paikalleen. Tutkimuksen mukaan hyväksi sekoitusajaksi muodostui 10 minuuttia.

### 7.2 Lämpökäsittelyt ja pH

Lämpökäsittelyn tarkoitus oli havainnollistaa, muuttaako kuumennus muodostuneen geelin koostumusta ja myös tutkia sen vaikutusta proteiinipitoisuuteen. Seoksen korkea lämpökäsittely on mahdollista, tosin perinteisellä keittolevy-kuumennuksella mikrobien tuhoamiseen tarvittavaan lämpötilaan ei tällä kokeella päästy turvallisesti. Tässä kokeessa olisi voitu käyttää kuumentamiseen kattilaa, joka olisi voinut mahdollistaa turvallisen kuumentamisen.

Lämpökäsittely ei muuttanut geelin koostumusta silmämääräisesti, mutta toi mukanaan kellertävää väriä (kuva 10 ja 11, s. 14). Lämpökäsittely ei

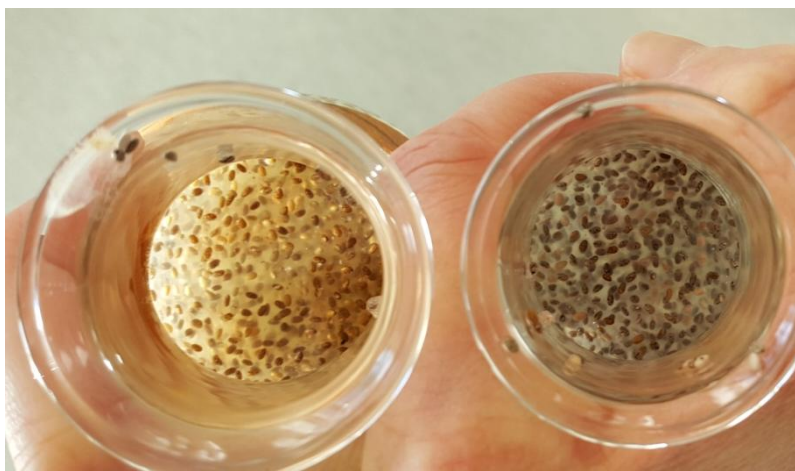
aiheuttanut suuria muutosta pH:ssa (taulukko 2, s. 11). Kiehuminen aiheutti voimakasta kuplimista.

Kokonaisten siementen välillä pH-ero oli 0,59 yksikköä. Tämä voisi viitata siihen, että ilman lämpökäsittelyä seos sisältäisi enimmäkseen vettä, vaikka siemen hajoaakin kuitujen reagoidessa veden kanssa (luku 3.2). Lämpökäsittely näyttäisi tehostavan siemenen ravintosisällön siirtymistä geeliin. Tätä teoriaa tuki myös lämpökäsitellyn näytteen pH-arvon samankaltaisuus rouhenäytteiden pH-arvojen kanssa.

Rouhittujen näytteiden pH-arvojen ero oli 0,48 yksikköä ja tässä oli myös otettava huomioon lämpökäsittelyn läpikäyneen näytteen RJ mittauslämpötila, joka oli mittaushetkellä korkea. Jos lämpökäsitelty näyte olisi ollut viileämpi, olisi pH-ero luultavasti ollut vieläkin pienempi. Näytettä ei ajanpuutteen vuoksi ehditty viilentämään enempää.



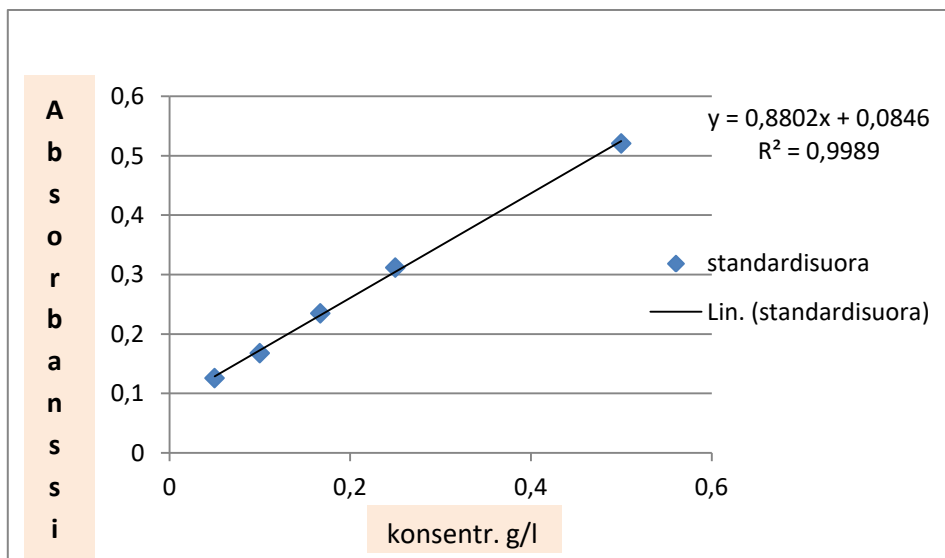
Kuva 10. Vasemmalta näytteet ennen proteiinimittausta järjestyksessä RJ, KJ, RE ja KE.



Kuva 11. Kokonaisia siemeniä sisältävät näytteet. Vasemmalla on lämpökäsittelyn saanut näyte.

### 7.3 Proteiinin määrittäminen geelistä, spektrofotometrin tulokset

Standardisuora on esitetty liitteessä 2. Sen perusteella saatiin yhtälö, jonka avulla laskettiin näytteen pitoisuudet (kuva 12).



Kuva 12. Spektrofotometrillä mitatuista standardi näytteistä saaduista absorbanssituloksista tehtiin kaavio, jonka avulla muodostettiin yhtälö näytteen pitoisuuksien laskemiseksi.

Näytteen absorbanssit saatiin osumaan standardisuoralle ja näin ollen tuloksia voitiin pitää luotettavina (Liite 3/1 ja 3/2). Vain standardisuoralle osuneiden näytteen absorbanssi tulokset otettiin mukaan näytteen pitoisuuden keskiarvon laskemiseen. Laskuissa oli myös huomioitu laimennoskerroin sekä laskettu keskiarvon hajonta (taulukko 3 s.16).

Taulukko 3. Näytteiden absorbanssit, laimennoskertoimet, yhtälön avulla lasketut pitoisuudet ja niiden keskiarvot ja hajonta. Punaisella merkityt näytteet ovat menneet raja-arvon yli, eikä niitä siksi huomioida.

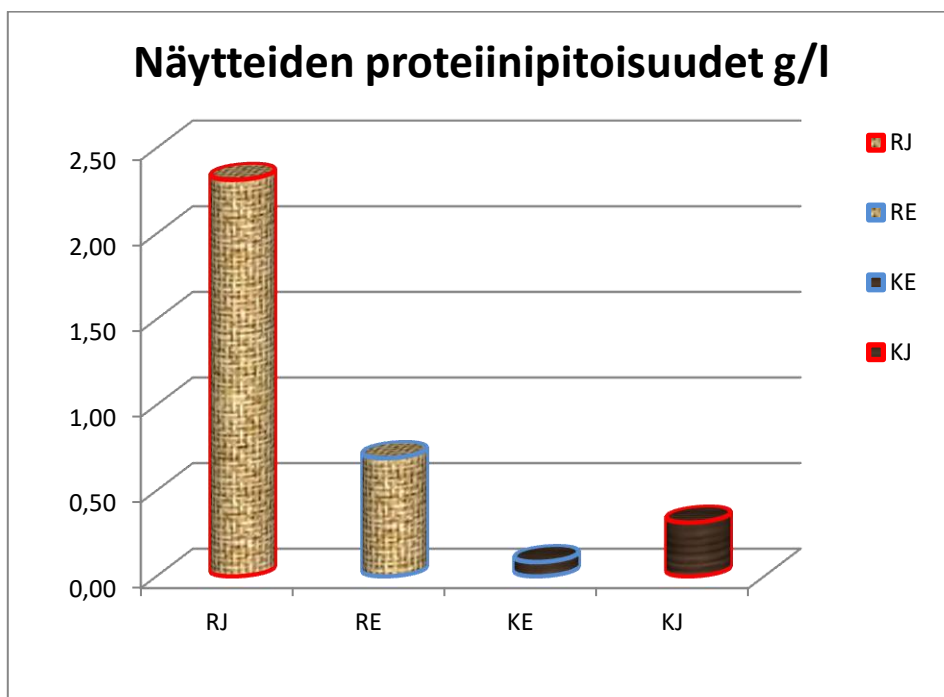
Näyte	absorbanssi	laimennos	pitoisuus g/l	pitoisuuksien keskiarvo	Keskiarv.hajonta
RJ	1,065	1:1	1,11		
RJ	0,263	1:10	2,03		
RJ	0,278	1:10	2,20		
RJ	0,324	1:10	2,72	2,31	0,36
RE	0,818	1:1	0,83		
RE	0,142	1:10	0,65		
RE	0,147	1:10	0,71		
RE	0,147	1:10	0,71	0,69	0,03
KE	0,087	1:1	0,00		
KE	0,09	1:10	0,06		
KE	0,203	1:1	0,13		
KE	0,202	1:1	0,13	0,08	0,06
KJ	0,385	1:1	0,34		
KJ	0,106	1:10	0,24		
KJ	0,226	1:2	0,32		
KJ	0,238	1:2	0,35	0,31	0,05

Rouhittu ja lämpökäsitelty näyte RJ sisälsi eniten proteiinia, 2,31 g/l. Vähiten proteiinia oli lämpökäsittämättömässä, kokonaisista siemenistä muodostuvassa näytteessä KE (kuva 13 s.17).

Tulokset näyttivät toteen sen teoreettisen oletuksen, että rouhitun siemenen ravintoaineet pääsisivät parhaiten geeliin, sillä siemen on rikottu mekaanisesti.

Ero proteiinipitoisuuksissa lämpökäsittämättömän ja lämpökäsitellyn näytteen välillä oli merkittävä. Lämpökäsittelyllä oli iso vaikutus proteiinipitoisuuteen geelissä. Lämpötilan nousu näyttäisi tehostavan proteiinien siirtymistä geeliin.

Mahdollista denaturoitumista voi esiintyä, mutta sillä ei ole tulosten kannalta merkitystä käytetyn menetelmän ansiosta.



Kuva 13. Näytteiden proteiinipitoisuudet keskiarvon mukaan. Mustat pylväät ovat kokonaisten siementen näytteitä ja ruskeat rouhitujen siementen. Pylvään ympärillä oleva punainen väri kertoo, että näyte on käynyt läpi lämpökäsittelyn.

## 8 PROSESSI JA SEN SUUNNITTELU

Tuotetta on tarkoitus valmistaa teollisesti. Prosessi suunniteltiin opinnäytetyössä ilmi käyneiden tutkimustietojen ja teorian pohjalta. Tässä luvussa käydään läpi kastikepohjan valmistukseen liittyvät prosessivaiheet ja niiden merkitys tuotteelle.

### 8.1 Siementen esikäsittely

Siemenet läpikäyvät UV-säteilytyksen, jotta siemenen ulkopuolella mahdollisesti olevat mikrobit tuhoutuisivat. Hihna kuljettaa siemenet UV-laitteen läpi.

Tämän jälkeen hihna kuljettaa siemenet murskaimeen, josta ne kulkevat ruuvikierukalla sekoitustankkiin.

### 8.2 Veden lisäys ja sekoitus

Sekoitustankissa siemenmurskaan lisätään vesi jatkuvalla sekoituksella. Massaa sekoitetaan vähintään 10 minuuttia seoksen paikalleen hyytymi-

sen estämiseksi sekä ravintoaineiden tasaisen geeliin siirtymisen takamiseksi.

### 8.3 Lämpökäsittely

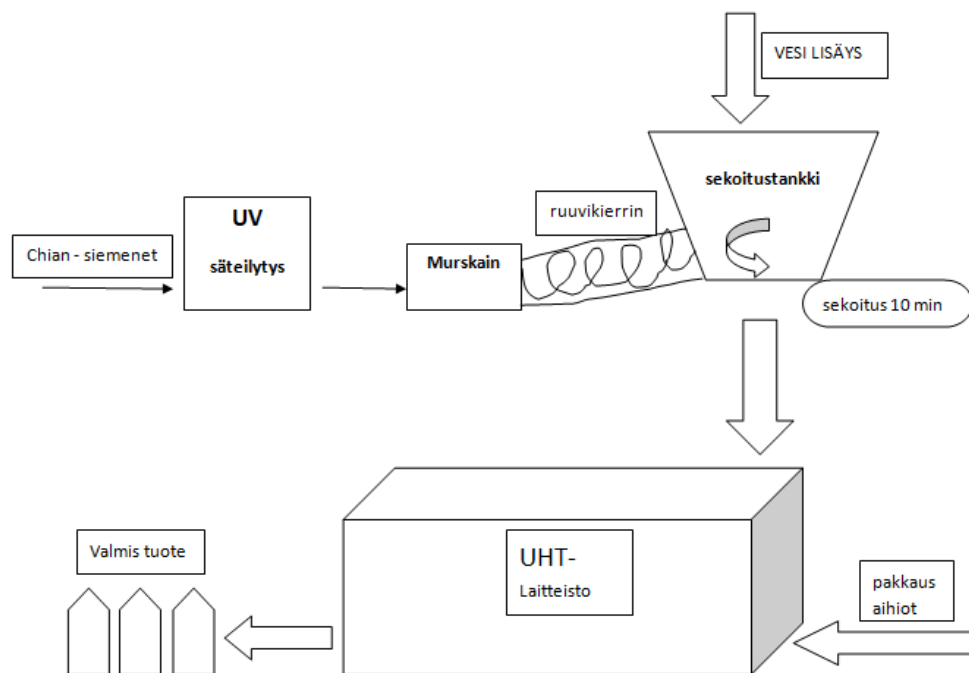
Sekoituksen jälkeen massa siirretään putkiston avulla UHT-laitteistolle, jossa se lämpökäsitellään. Tämä takaa tuotteelle hyvän mikrobiologisen laadun sekä pitkän hyllyiän.

### 8.4 pakkaus ja varastointi

Tuotteen pakkausmateriaalit eli aihiot kulkevat UHT-laitteistossa mm. UV-valon läpi. Tämä turvaa myös aihoiden mikrobiologisen laadun. Tuote pakataan aseptisesti korkillisiin kartonkipakkauksiin. Pakatut tuotteet siirretään varastoon.

### 8.5 Prosessin vuokaavio

Prosessin vaiheet on esitetty vuokaaviossa (kuva 14).



Kuva 14. Prosessin vuokaavio.



## 9 PÄÄTELMÄT JA POHDINTA

Rikkain proteiinisisältö oli lämpökäsitellyllä näytteellä, jonka chian siemenet oli rouhittu. Rouhinta rikkoi siemenen vapauttaen proteiinit geeliin. Kokonaisten siementen kohdalla voitiin havaita geelissä proteiineja, vaikka siemenet olivatkin ehjiä. Luvussa 3.2 käsitellään siemenen ulkokuoren hajoamista, kun kuidut reagoivat nesteen kanssa. Tästä syystä siemenen ulkokuori ei ole enää tiivis ja se mahdollistaa proteiinien ulospääsyn siemenestä. Tämä selittäisi löydetty proteiinit kokonaisten siementen näytteistä.

Lämpökäsittely tehosti selvästi proteiinien siirtymistä sekä kokonaisista että rouhituista siemenistä geeliin. PH-mittaukset tukivat saatuja tuloksia. Kokonaisten siementen kohdalla lämpökäsittelmättömän näytteen pH indikoi geelin sisältävän enimmäkseen vettä, kun taas lämpökäsitellyssä näytteessä havaittiin pH:n lasku. Tämä kertoi geelin sisältävän muutakin kuin vettä ja sen pH:n samankaltaisuus rouhittujen näytteiden pH-arvojen kanssa tuki myös tätä olettamusta. Lämpökäsittely ei silmämääräisesti aiheuttanut muutoksia geelin rakenteeseen, mutta toi mukanaan kellertävää väriä.

Vettä tarvittiin rouhittujen siementen seokseen enemmän, koska siemenmassaa oli enemmän. Geelin muodostus oli kuitenkin lähes samaa luokkaa kuin kokonaisilla siemenillä.

Koska koiran ruoansulatuskanava on lyhyt, se ei pysty hyödyntämään kunnolla kasviravintoa, jolle ei ole tehty esikäsitelyjä. Tämän perusteella voidaan olettaa, että koiran elimistö hyötyisi parhaiten rouhituista siemenistä. Kun siemen on rikottu mekaanisesti, se mahdollistaisi ravintoaineiden pääsyn geeliin tehokkaimmin. Lämpökäsittely näyttäisi tehostavan proteiinien siirtymistä geeliin, joten lämpökäsittelyä tuotteelle voidaan pitää perusteltuna. Lämpökäsittely takaisi myös tuotteelle paremman mikrobiologisen laadun.

Proteiinipitoisuuden määritykset onnistuivat valitulla menetelmällä hyvin ja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Siementen ja veden suhde-koesarja onnistui myös hyvin ja sillä aikaansaatiin halutunlaisilla ominaisuuksilla olevat seokset. Lämpökäsittely ei onnistunut suunnitelmien mukaan. Seokset olisi voitu kuumentaa esimerkiksi kattiloissa, jolloin ylikiehumisen riskiä tuskin olisi esiintynyt. Lämpötila saatiin kuitenkin lähelle veden kiehumispistettä.

Opinnäytetyössä onnistuttiin selvittämään johdannossa esiin tulleet tutkimuskysymykset ja niiden perusteella pystyttiin luomaan kastikepohjalle valmistusprosessi.

## LÄHTEET

ABC news (2016). A chia crop flowering in the Ord irrigation scheme. Kuva noudettu 18.02.2018 osoitteesta

<http://www.abc.net.au/news/2014-09-25/chia-crop-flowering-ord-valley-kimberley/5629742>

Ali, N., Yeap, S., Ho, W., Beh, B., Tan, S.W. & Tan, S.G. (2012). The promising future of Chia, *Salvia hispanica* L. Haettu 12.01.2018 osoitteesta

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518271/>

Amazon (n.d.). Chia pet handmade decorative planter, puppy, 1 kit. Kuva noudettu 18.02.2018 osoitteesta

<https://www.amazon.com/Chia-Handmade-Decorative-Planter-Puppy/dp/B000AIGB96>

Chia de Gracia (n.d.). Chia siemenet. Haettu 18.02.2018 osoitteesta

[https://www.chiadegracia.fi/epages/chia.sf/fi\\_FI/?ObjectPath=/Shops/2014111704/Categories/Chiasiemenet1](https://www.chiadegracia.fi/epages/chia.sf/fi_FI/?ObjectPath=/Shops/2014111704/Categories/Chiasiemenet1)

Evidensia (n.d.). Koiran terveellinen ruokinta. Haettu 18.02.2018 osoitteesta

<https://elaintenhoidonopas.fi/artikel/koiran-terveellinen-ruokinta/>

Evira (2018A). Uuselintarvikkeet. Haettu 22.02.2018 osoitteesta

<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/yhteiset-koostumusvaatimukset/uuselintarvikkeet/>

Evira (2018B). EU – lainsäädäntö. Haettu 06.04.2018 osoitteesta

<https://www.evira.fi/elaimet/rehut/lainsaadanto/eu-lainsaadanto/>

Evira (2015). Rehujen merkinnät. Haettu 06.04.2018 osoitteesta

[https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/rehut/ohjeet/rehujen\\_merkintaopas.pdf](https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/rehut/ohjeet/rehujen_merkintaopas.pdf)

Heal with food (n.d.). Chia seed: Side effects and allergic reactions. Haettu ja Kuva noudettu 18.02.2018 osoitteesta

<https://www.healwithfood.org/side-effects/chia-seed-allergies.php>

Korkalainen, K. (2018). Lemmikkieläimille myytävät kasvipohjaiset valmisteet. Sähköposti tekijälle 5.4.2018

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Haettu 14.04.2018 osoitteesta

<http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry%201951.pdf>

Luontaistukku (n.d.). Chian siemenet 250g. Haettu 12.01.2018 osoitteesta [https://www.luontaistukku.fi/luomu-chian-sieme-net?gclid=CjwKCAiA1uHSBRBUEiwAkBCtzUfE4FsGgRs5eKaeHXY\\_q9Duc8UzY-mHq81CQ7jwmIM6dn17GWGfvxoCA8QQAvD\\_BwE](https://www.luontaistukku.fi/luomu-chian-sieme-net?gclid=CjwKCAiA1uHSBRBUEiwAkBCtzUfE4FsGgRs5eKaeHXY_q9Duc8UzY-mHq81CQ7jwmIM6dn17GWGfvxoCA8QQAvD_BwE)

Luontaistukku (2018). Chian siemenet. Sähköpostiviesti tekijälle 22.02.2018

Muñoz, L., Cobos, A., Diaz, O. & Aguilera, J. (2011). Chia seeds: Micro-structure, mucilage extraction and hydration. Haettu 05.04.2018 osoitteesta <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877411004560>

MySeed Chia (n.d.). Learn about Chia seed hydration: Fiber & water for health. Haettu 21.02.2018 osoitteesta <https://www.mychiaseeds.com/articlehydration.html>

Petruzzello, M. (2017). Chia plant. Haettu 18.02.2018 osoitteesta <https://www.britannica.com/plant/chia>

Singh, J. (2014). Chia ceed allergy. Haettu 18.02.2018 osoitteesta <https://www.ayurtimes.com/chia-seed-allergy/>

Proteiini määrittäksessä käytetty menetelmä ohje.

## Analysis of soluble protein concentration with the Lowry method

### Aim

To determine protein content.

### Applicability

The method can be used to analyze protein containing solutions.

### Principle

The protein analysis is based on the use of Folin-Ciocalteu phenol reagent. Proteins form a complex with  $\text{Cu}^{2+}$  ions in alkaline solutions. The complex reduces the phenol reagent.

### Safety

The Folin-Ciocalteu phenol reagent contains phosphoric acid and hydrochloric acid. Causes eye and skin irritation. Splatters in the eyes must be rinsed immediately with abundant amount of water and one must go to a doctor.

The aqueous solution of trichloroacetic acid (TCA) and its fumes are very acidic. Splatters corrode and burn the skin, eyes, and mucous membrane. Dust irritates the respiratory tract. Work must be performed under a fume hood and protective gloves and goggles must be worn. When handling solid matter also respirator mask must be worn. Read more detailed instructions from the operational safety bulletin.

### Reagents

A: 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (or 54 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )

4 g NaOH

Distilled water is added to a final volume of 1000 ml

B1: 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Distilled water is added to a final volume of 100 ml

B2: 2 g Na-K-tartrate ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ )

Distilled water is added to a final volume of 100 ml

C: 1 ml reagent B1

1 ml reagent B2

100 ml reagent A

Mix the reagents in this order just before use, because the solution will keep for just a few hours.

D: Dilute Folin-Ciocalteu phenol reagent (Oy Reagent LTD) to half (1 part H<sub>2</sub>O + 1 part phenol reagent) with distilled water before use.

Equipment and materials

Test tubes, pipettes, vortex-mixer, timer, centrifuge, and spectrophotometer

Pre-treatment of samples

If needed, the samples can be filtered or centrifuged.

Analysis

Pipette 1 ml of sample to a test tube. If the sample is solid, it is advisable to dissolve it in mild buffer (e.g. 50 mM citrate buffer pH 5; 1 mg/ml or 10 mg/ml) before precipitation.

Precipitate the proteins in the sample by adding 1 ml of TCA (or 3 ml of acetone or 3 ml of ethanol) and mix. Let the test tubes stand for 30 min at +4 °C.

Centrifuge for 15 min, 3000 rpm, after which pour the supernatant away.

Dissolve the precipitate in 1 ml of reagent A. Use magnetic stirring if necessary.

The protein concentration of this solution is the same as it was in the original sample. The precipitation is performed to separate whole proteins from the oligopeptides that might be present in the solution. The oligopeptides would participate in the Folin reaction causing seemingly too high protein concentration result. If the original solution does not contain disturbing amounts of small molecular sized peptides, the precipitation phase can be skipped and the protein concentrations can be determined straight from the original protein solution starting from part 5.

Pipette 250 µl of protein containing sample to a new test tube from part 4 or use the original solution. The protein concentration should be 0,05 – 0,5 g/l (mg/ml). Dilute the samples to water.

Add 2,5 ml of reagent C and mix well. Incubate exactly 10 min at room temperature.

Add 250 µl of reagent D and mix immediately. Let the samples stand for 30 min at room temperature. Then measure the absorbance at 550 nm against reagent blank.

Reagent blank

250 µl of reagent A

2,5 ml of reagent C

250 µl of reagent D

Protein standard

Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma A-8022) is used as standard. Make 50 mg/100 ml H<sub>2</sub>O stock solution. The stock solution can be stored in 1,5 ml batches in a freezer. After defrosting, the tubes should be mixed thoroughly because freezing causes layering of the solution. The stock solution should be diluted to water as follows:

$$1 \times (\text{=undiluted}) = 0,5 \text{ g/l (mg/ml)}$$

$$2 \times (500 \mu\text{l} + 500 \mu\text{l}) = 0,25$$

$$3 \times (250 \mu\text{l} + 500 \mu\text{l}) = 0,167$$

$$5 \times (200 \mu\text{l} + 800 \mu\text{l}) = 0,1$$

$$10 \times (100 \mu\text{l} + 900 \mu\text{l}) = 0,05$$

Standard solutions are treated as samples (though without the precipitation phase 1 – 4).

#### Calculation of the results

The measured absorbances of the samples are converted into protein concentrations with a standard line. The original concentration of a sample can be calculated by multiplying with the dilution factor.

#### The accuracy of the method and sources of error

There are several variations of the Lowry method. Some of them are described here:

The volume of the sample can be smaller or higher than the 1 ml described here. If the volume is changed, the precipitation reagent volume should be changed as well to correspond to the ratio of protein solution and precipitation reagent described here.

Sometimes the precipitation is performed with acetone (3 ml) or 99,5% ethanol (3 ml). TCA does not precipitate all the extracellular microbial enzymes (e.g. Pectinases from *Aspergillus* and  $\beta$ -xylosidases from *Trichoderma*). Thus, the use of TCA is not recommended with at least these fungal enzymes. When using ethanol precipitation, the result is somewhat lower than with acetone, but the benefit is that the enzyme remains active during the precipitation.

The precipitate can be dissolved in any volume of reagent A. If another volume than the original is used, it should be taken into account when calculating the results.

If the precipitate from ethanol precipitation is dissolved in a milder solution than reagent A (e.g. buffer), both activity and protein concentration can be analyzed from the same solution.

Sometimes the measurement is performed at 700 nm, especially if the protein concentration is very low (causing a weak color formation).

If any modification of the method is used, one should keep in mind that:

The standards should be treated in the same way as samples (exception: standard solution should not be precipitated)

All volume changes should be taken into account if they affect the calculation of the results

#### Literature

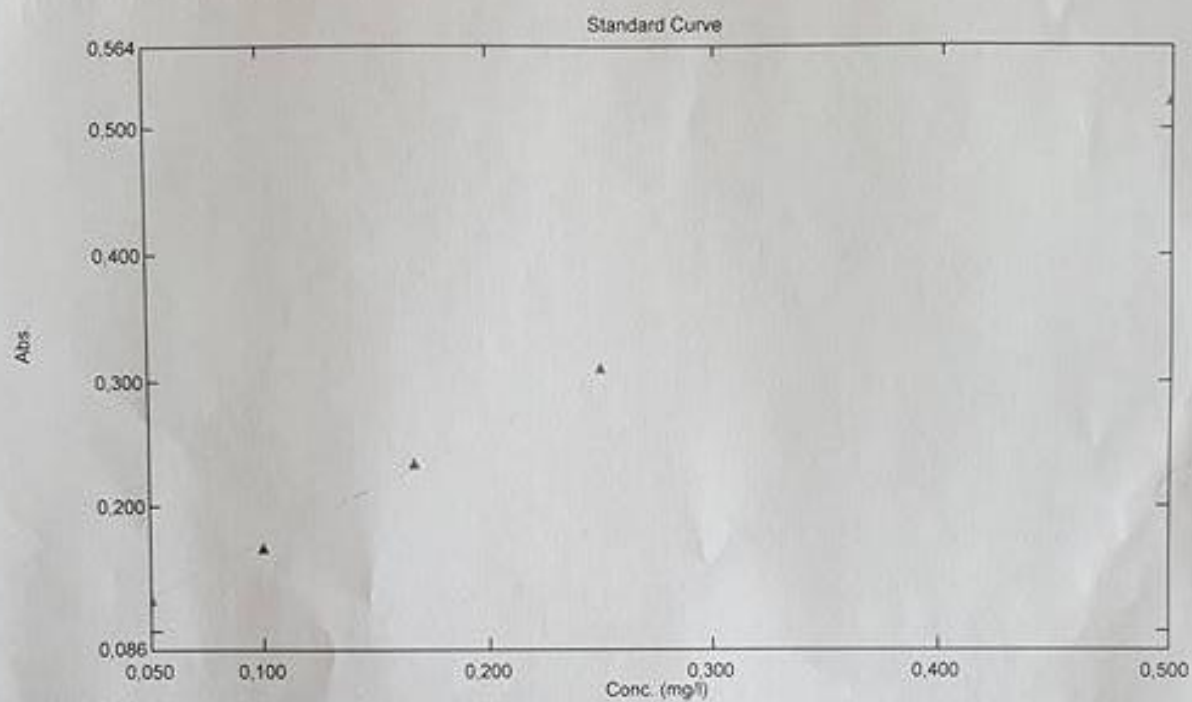
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ja Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.

## Spektrofotometrimääritykset standardinäytteistä

## Standard Table Report

01.01.2009 00:50:23

File Name: C:\EmmaRoberts\File\_090101\_003233.pho



Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL550,0	Wgt.Factor	Comments
1	1	Standard		0.500	0.521	1.000	
2	2	Standard		0.250	0.312	1.000	
3	3	Standard		0.167	0.235	1.000	
4	5	Standard		0.100	0.168	1.000	
5	10	Standard		0.050	0.126	1.000	
6							

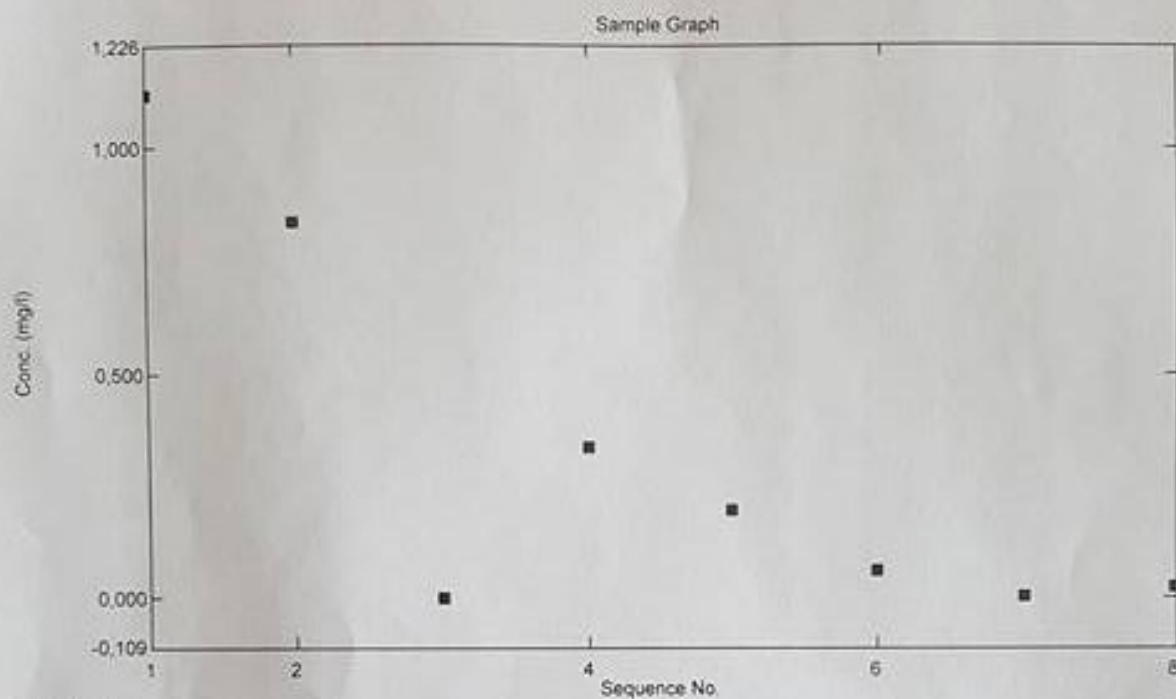


Spektrofotometrimääritykset chian siemen näytteistä

## Sample Table Report

01.01.2009 00:49:58

File Name: C:\EmmaRoberts\File\_090101\_003233.pho



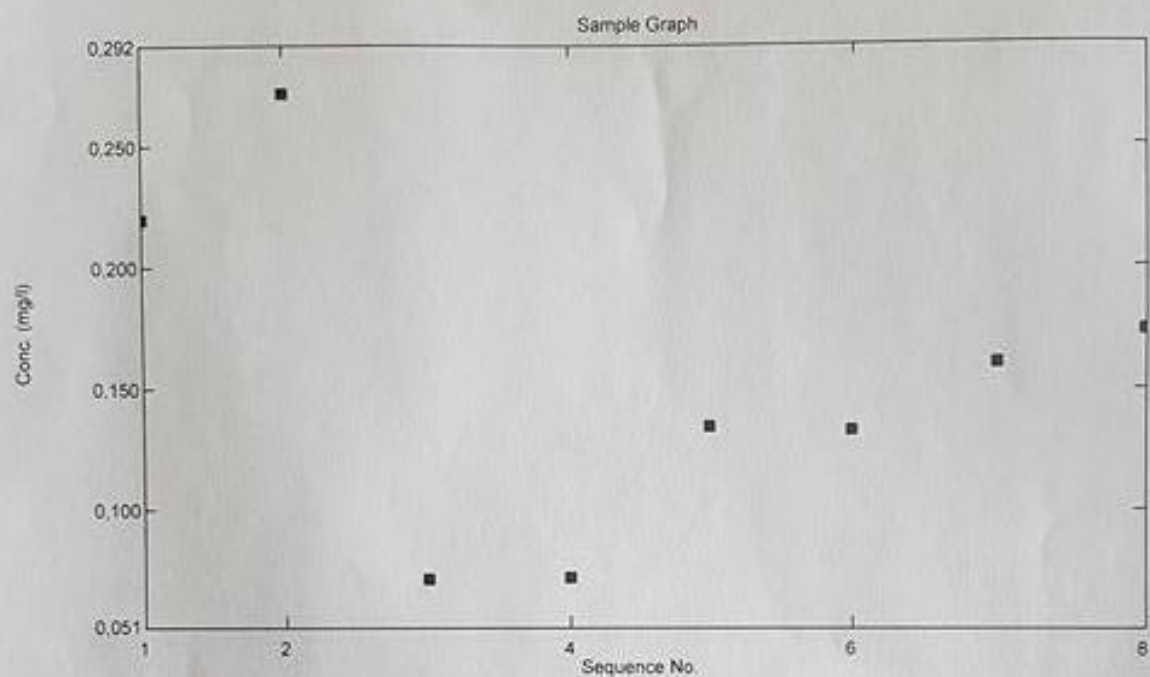
Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL550,0	Comments
1	RJ	Unknown		1,115	1,065	
2	RE	Unknown		0,834	0,818	
3	KE	Unknown		0,003	0,087	
4	KJ	Unknown		0,342	0,385	
5	RJ 1:10	Unknown		0,202	0,263	
6	RE 1:10	Unknown		0,065	0,142	
7	KE 1:10	Unknown		0,006	0,090	
8	KJ 1:10	Unknown		0,024	0,106	
9						

# Sample Table Report

01.01.2009 01:58:01

File Name: C:\EmmaRoberts\File\_090101\_003233.pho



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL550,0	Comments
1	RJ 1:10	Unknown		0.220	0.278	
2		Unknown		0.272	0.324	
3	RE 1:10	Unknown		0.071	0.147	
4		Unknown		0.071	0.147	
5	KE	Unknown		0.135	0.203	
6		Unknown		0.134	0.202	
7	KJ 1:2	Unknown		0.161	0.226	
8		Unknown		0.174	0.238	
9						